

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-232858

(43)公開日 平成4年(1992)8月21日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 33/531

識別記号
B 8310-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数2(全6頁)

(21)出願番号 特願平3-179098

(22)出願日 平成3年(1991)7月19日

(31)優先権主張番号 P 4 0 2 3 6 7 1. 4

(32)優先日 1990年7月25日

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 390009450

ベーリンガー マンハイム ゲゼルシヤフト ミット ベシユレンクテル ハフツング

BOEHRINGER MANNHEIM GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国 マンハイム 31 ザントホーフエルストラーゼ 116

(72)発明者 ベーター シュルーカ

ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム ローゼンシュトラーゼ 39

(74)代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

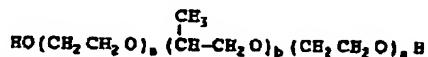
最終頁に続く

(54)【発明の名称】イムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法及び試薬

(57)【要約】

【目的】界面活性剤として式I:

【化1】



【式中 aは数値4.0~1.5.0でありかつbは数値1.0~5.0である】のポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-ブロック共重合体を使用して、反応成分の1つが固相中に存在するイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法。

【構成】1% - 水溶液(重量/容量) 中で表面張力少なくとも4.5mN/mを有しあつ組成物中のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基の平均モル比(2a/b)が少なくとも5.8である式の親水性ブロック共重合体組成物を使用する。

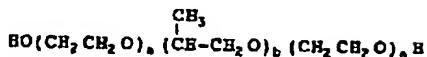
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 界面活性剤として式I:

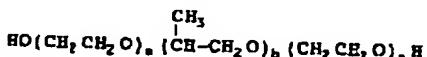
【化1】



【式中 a は数値 40 ~ 150 でありかつ b は数値 10 ~ 50 である】のポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-ブロック共重合体を使用して、反応成分の1つが固相中に存在するイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法において、1% - 水溶液（重量 / 容量）中で表面張力少なくとも 45 mN/m を有しあつ組成物中のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基の平均モル比 (2 a / b) が少なくとも 5.8 である I 式の親水性ブロック共重合体組成物を使用することを特徴とするイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法。

【請求項2】 界面活性剤として式I:

【化2】



【式中 a は数値 40 ~ 150 でありかつ b は数値 10 ~ 50 である】のポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-ブロック共重合体を含有する、反応成分の1つが固相中に存在するイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法を実施するための試薬において、1% - 水溶液（重量 / 容量）中で表面張力少なくとも 45 mN/m を有しあつ組成物中のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基の平均モル比 (2 a / b) が少なくとも 5.8 である I 式の親水性ブロック共重合体組成物を含有することを特徴とするイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、イムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法及び試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 プロピレンオキシド及びエチレンオキシドからの非イオン性ブロック共重合体、所謂ポロキサマー (Poloxamer) は既に長年知られておりかつ低い起泡性界面活性剤として、例えば清浄剤、可溶化剤、増粘剤、乳化剤及び分散剤中の弱起泡性成分として広く使われている [例えば Ullmann's Enzyklopädie der technischen Chemie, 19巻, 4版, Verlag Chemie 出版 (Weinheim在) 参照]。

【0003】 このブロック共重合体を不均一相で行なうイムノアッセイの界面活性剤として使用することはヨーロッパ特許公開第0215457号明細書に開示されて

いる。

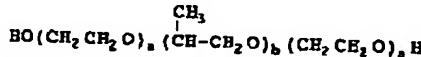
【0004】 不均一相のイムノアッセイでは反応成分の一方、殊に抗体は担体に結合して存在する。不均一相で免疫測定を実施するには種々の方法、例えばサンドウイッチ法、間接的方法、競合的方法及び他の方法が知られており、ヨーロッパ特許公開第0215457号明細書に詳細に記載されている。

【0005】 不均一相の免疫測定では、しばしば非特異的妨害が起り、これは様々な原因により起りかつとりわけ“マトリクス効果”、“バックグラウンド”及び“非特異的結合”と表わされる。特に血漿試料では測定すべき物質の不良な再現性が確認されている。

【0006】 ヨーロッパ特許公開第0215457号明細書によれば非特異的結合を低減するために温度 15 ~ 40°C で行なう、反応成分の1つが固相中に存在するイムノアッセイ原理による免疫反応の成分を測定する方法が提案されており、この方法は HLB 値 20 以上の界面活性剤を添加することを特徴とする。界面活性剤として C 原子 2 ~ 4 個を有するアルキレンオキシドをベースとする非イオン性ブロック共重合体、特に式I:

【0007】

【化3】



【0008】 【式中 a は数値 30 ~ 150 でありかつ b は数値 15 ~ 60 である】の化合物を使用する。ポリエチレンオキシド基 / ポリプロピレンオキシド基 - モル比 (2 a / b) は 1 ~ 20 であってよい。

【0009】 I 式の界面活性化合物は、試料（血漿）の特定の成分と反応容器の表面との非特異的相互作用を阻止しあつ同時に異種の、即ち表面に吸着されている反応成分を分離させない。

【0010】 ヨーロッパ特許公開第0215457号明細書による不均一な免疫学的試験系には特異性が必要な性質に相当する市販されているブルロニック列もしくはシンペロニック列のポロキサマー（製造者： BASF もしくは ICI）の一定の型のものが使われる。ところがいくつかの試験では被分析物の再現性並びに検量曲線の勾配が市販されている界面活性剤のその都度使われる製造者のパッチに大きく左右されることが明らかになり驚異的であった。これらの試験には選択したごく僅かのパッチだけが使用できることが認められた。それ故、個々のパッチの適性をその都度経費のかかる機能試験で確定する必要がある。

【0011】

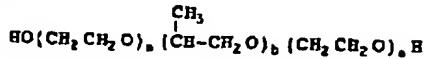
【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の課題は不均一系イムノアッセイで使用するに当り再現可能で好適な I 式のブロック共重合体組成物を開示することであった。

50 【0012】

【課題を解決するための手段】本発明による課題は、界面活性剤として式1：

【0013】

【化4】



【0014】 [式中 a は数値 40~150 でありかつ b は数値 10~50 である] のポリエチレンオキシドーポリプロピレンオキシドー共重合体を使用して、反応成分の 1 つが固相中に存在するイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法において、1% - 水溶液 (重量/容量) 中で表面張力少なくとも 4.5 mN/m を有しかつ組成物中のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基の平均モル比 (2a/b) が少なくとも 5.8 である I 式の親水性プロック共重合体組成物を使用することを特徴とするイムノアッセイ原理による免疫反応における成分を測定する方法により解決される。

【0015】一般に、プロック重合体は化学的な单一化合物としてではなく、異なる分子量及びポリエチレンオキシド (EO) 基とポリプロピレンオキシド (PO) 基との異なるモル比を有する数種の単一化合物からの混合物として存在する。この理由から数値 a 及び b は混合物に関して分子量及びモル比 (EO/PO) から確定することのできる平均値である。

【0016】本発明方法では、界面活性物質、即ち I 式の親水性プロック共重合体組成物を全反応パッチの重量に対して 0.1~5% の量で使用すると有利であることが明らかになった。

【0017】本発明による親水性プロック共重合体組成物の使用は血漿中の物質の測定でも、また血清中の物質の測定でも利点をもたらす。両方において反応が加速されかつ測定すべき物質の改良された再現性、特に血漿を測定する際に常用の市販のプロック共重合体を使用する場合に比べて改良された再現性が認められる。

【0018】本発明方法はすべての種類の血漿に適用可能である。それ故、安定化のために EDTA、ヘパリン又はクエン酸塩を加えた血漿中でも物質を測定することができる。

【0019】本発明による親水性プロック共重合体組成物の添加は測定に使われるそれぞれの溶液で行なうことができる。例えば測定をサンドウイッチ原理により実施する場合、第一工程で抗体を担持物質に吸着させ、この吸着工程の後で牛血清アルブミン溶液で処理し (表面を飽和するため) かつ引続いて塩/洗浄剤溶液で洗浄すると有利である。次の工程で測定すべき物質と、抗原及び結合した第一抗体からの複合体又はこの複合体の部分に対する標識特異的抗体を含有する試験溶液を添加する。その際に標識抗体を酵素、例えばペルオキシダーゼと接

合すると有利である。固相に結合した標識抗体を介して抗原、即ち測定すべき物質の量を計算することができる。本発明方法では親水性プロック共重合体は試験溶液中に存在する。

【0020】本発明方法に好適である親水性プロック共重合体組成物中のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基の平均モル比は 5.8 以上、即ちプロック共重合体組成物はエチレンオキシド少なくとも 81.5 重量% を含有する。本発明において “組成物” とは、既に記載したようにプロック共重合体が均一である必要はなく、一般に異なる分子量もしくは異なるモル比のエチレンオキシド基とプロピレンオキシド基を有する数種の成分もしくはフラクションから構成されていることを表わす。組成物中のエチレンオキシド (EO) 基とプロピレンオキシド (PO) 基との平均モル比は少なくとも 5.8 である。つまり全組成におけるモル比が少なくとも 5.8 である場合には、EO 基/PO 基の比が 5.8 より低いプロック共重合体の成分もしくはフラクションも本発明による組成中に存在してもよい。しかしながら EO/PO < 5 のフラクションの割合は 2.5 重量% を上回ってはならず、殊に組成物の 5 重量% を上回るべきではない。

【0021】1% - 水溶液 (重量/容量) 中で表面張力 4.5~5.5 mN/m を有しかつエチレンオキシド/プロピレンオキシド (2a/b) - 平均モル比が 5.8~1.5 である I 式の親水性プロック共重合体組成物の使用が優れている。殊に b は 1.5 より大きく、特に 2.2 より大きくない。殊に a は 5.0~7.0、特に 5.3~6.3 が優れている。

【0022】本発明方法に好適な親水性プロック共重合体組成物は、一般式 I の化合物が該当しかつ全体としてはイムノアッセイの界面活性剤としては好適ではない市販のプロック共重合体の分別により簡単に得られる。

【0023】市販の I 式のプロック共重合体の不適当なパッチをジアイオン (Dialion) HP 20 カラムを介してクロマトグラフィ処理しかつ水/イソプロパノールで傾斜溶離することにより、単独で判定試験に完全に使用することのできる市販のプロック共重合体の親水性画分が得られ驚異的であった。種々の好適な画分からの混合物を使用することもできる。好適な画分又は “組成物” を単離することのできる好適な市販のプロック共重合体の例はシンペロニック (Syneronic : 登録商標) PE/F-68 (ICI)、ブルニック (Buronick : 登録商標) F-68 (BASF)、ゲナポール (Genapol : 登録商標) PF 80 (Hoechst) 及びテキサドリル (Texadriil : 登録商標) 8780 (Henkel) である。

【0024】本発明方法では、基本的に疎水性成分を含まず、エチレンオキシド基/プロピレンオキシド基 - モル比 (2a/b) が 5 より低い親水性プロック共重合体組成物を使用すると優れている。基本的に含まれないと

5

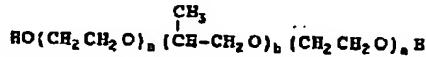
は、親水性ブロック共重合体がプロピレンオキシド基の高い割合を特徴とする疎水性成分を1%より低量で、殊に0.5%より低量で含有することを表わす。

【0025】本発明方法が黄体形成ホルモン(LH)又は卵胞刺激ホルモン(FSH)の測定に特に好適であることが明らかになった。

【0026】更に、本発明の目的は本発明方法を実施するための試薬であり、これは界面活性剤として一般式1:

【0027】

【化5】



【0028】のポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-ブロック共重合体を含有し、その際ブロック共重合体組成物は1% - 水溶液(重量/容量)中で表面張力少なくとも45mN/mを有しあつ組成物中のエチレンオキシド基/プロピレンオキシド基の平均モル比(2a/b)が少なくとも5.8である。本発明による試薬が一般式Iを有する市販されているポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-共重合体の好適な画分1種又は数種を含有すると有利である。

【0029】本発明方法を実施するに当り、免疫反応の運動性成分及び/又は固定化成分及び更に常用の内容物を含有してよい試薬を使用する。緩衝物質、例えばリン酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、硼素酸塩緩衝液等及び/又は牛血清アルブミン及び/又は保存剤も含有すると有利である。免疫反応の標識として酵素を使用する場合*

EO/PO	OF張力	MM	b	a
6.21	45.2	5700	17	53

表I シンペロニックPE/F-68の好適ではないパッ

画分	EO/PO	OF-張力 (1%-溶液)	MM	b	a	重量% (%)
分別						
せず	5.65	40.0	5800	19	54	100
1	14.43	51.8				0.8
2	-	-				0.3
3	13.13	49.6				0.8
4	9.08	49.0	6500	14	63	11.7
5	7.64	48.3	5500	14	53	8.8
6	5.82	45.2	6800	22	63	25.8
7	4.47	43.8	6800	27	60	22.0
8	4.13	38.4	6900	29	59	10.1
9	3.65	41.2	7060	32	59	10.8
10	3.53	40.4				2.7
11	3.30	39.7	6500	32	53	5.4
12	2.87	38.1				0.5

EO/PO: エチレンオキシド基とプロピレンオキシド基のモル比 H-NMR 中のオキシメチレンプロトン及びメチルプロトンのシグナル強度から次の一般式により 50

は、試薬は酵素活性を検出する系も含有する。

【0030】本発明方法及び試薬により、均一相におけるイムノアッセイでの再現性を、市販されているI式のブロック重合体を使用する方法に比べて改良することができる。

【0031】

【実施例】次に本発明を実施例及び図面につき詳説する。

【0032】例1 界面活性剤分別界面活性剤シンペロニックPE/F-68 (製造者: ICI、ポリプロピレンオキシド-ポリエチレンオキシド-ブロック共重合体) は製造者により提供された形では黄体形成ホルモン(LH)及び卵胞刺激ホルモン(FSH)を検出するためのエンチムン(Enzymun)試験で使用するのに好適ではない。この界面活性剤の40%(w/v)-水溶液を5倍容量のジアイオンHP20(製造者: ミツビシ・ケミカルズ)と一緒にカラムに施し、引続いてイソプロパノール分が増加する水/イソプロパノール傾斜溶離液で段階的に溶離する。各傾斜段階について3つの画分を捕集しあつ溶剤を蒸発させた。好適な画分は溶剤混合物中のイソプロパノール割合20~40%で溶離された。合計12個の画分が得られ、引続いてこれらの特性を明らかにしあつ例2による機能試験で評価した。画分の分析データを表Iに掲載した。

【0033】比較のために免疫学的測定(例えばLH及びFSHの測定)に好適な一般式Iのブロック共重合体の参照バッチの分析データを記載する:

チ13の分別に関する分析データ

分別	EO/PO	OF-張力 (1%-溶液)	MM	b	a	重量% (%)
せず	5.65	40.0	5800	19	54	100
1	14.43	51.8				0.8
2	-	-				0.3
3	13.13	49.6				0.8
4	9.08	49.0	6500	14	63	11.7
5	7.64	48.3	5500	14	53	8.8
6	5.82	45.2	6800	22	63	25.8
7	4.47	43.8	6800	27	60	22.0
8	4.13	38.4	6900	29	59	10.1
9	3.65	41.2	7060	32	59	10.8
10	3.53	40.4				2.7
11	3.30	39.7	6500	32	53	5.4
12	2.87	38.1				0.5

計算する:

$$\frac{I_0 - I_x}{I_0} \cdot 0.75$$

I_0 = オキシメチレンプロトンの積分シグナル強度

I_x = メチルプロトンの積分シグナル強度

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルはブルカーベルク (Bruker) 100 MHz 分光計により D₂O 中で測定した。

【0034】OF 強力(表面張力) :

蒸留水中の重合体の 1% (w/v) 溶液中で ウィルヘルミー (Wilhelmy) 法により測定した [C. Wesser, GIT Fachzeitschrift fuer das Laboratorium, 24, 642~648 及び 734~742 (1980)]。クリュス (Krueess) 社のデジタル・テンシオメータを使用した。

【0035】MM : 平均分子量

末端基分析により測定した [C. Ogg, W. L. Porter, C. O. Willis, Ind. Eng. Chem. Anal., 17, 394~397 (1945)]。

【0036】重量%:

全重合体に対する画分の割合:

画分の重量 (g)

----- · 100

使用した重合体の重量 (g)

画分 4, 5, 6 及び 画分 4~6 のプールを試験した。画分 4, 5 及び プールは検量曲線及び再現性に関して完全に好適であった (参照パッチに対する最大許容偏差 10% で)。画分 6 は限定的に好適である (検量曲線が非常にフラットである) が、プールでは完全に好適であった。

【0037】例2

10

20

30

8

サンドウイッチ原理による黄体形成ホルモン (LH) の測定

塩水緩衝液 (0.04 mol/l リン酸二水素ナトリウム, pH 7.4) 中の LH に対するモノクロナール抗体 (ヨーロッパ特許公開第 0193881 号明細書) を濃度 1.5 μg/ml で含有する溶液 1.5 ml をプラスチック試験管中に装入しあつ室温で 24 時間恒温保持する。引続いて 0.9% NaCl 中の 1% 牛血清アルブミンの溶液と一緒に室温で 30 分間恒温保持する。洗浄及び乾燥後に、各試験管中に試料 100 μl (血清又は LH 0~25 mU/ml を含有する LH 標準溶液、LH コード 68/40 の第一 IRP 標準により標準化、第一 IRP = WHO の第一国際参考調製) を作業溶液 1 ml と一緒に加えかつ 120 分間恒温保持する。この作業溶液は抗-LH-ペルオキシダーゼ接合体 (ヨーロッパ特許公開第 0193881 号明細書による抗体及びペルオキシダーゼからの接合体 80 mU/ml) を 0.04 mol/l リン酸塩緩衝液 pH 7.4、例 1 によるプロック重合体 (6 g/l) 及び PEG 40000 (10 g/l) 中に含有する。

【0038】洗浄緩衝液 (0.9% NaCl, 0.1% ツイーン 20) で洗浄後に、1.00 mmol/l リン酸塩/クエン酸塩緩衝液 pH 4.4, 3.2 mmol/l 過酸化水素ナトリウム及び 1.9 mmol/l ABTS (2,2-アシノーピス(3-エチルベンザチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩) からの溶液を添加しあつ 1 時間の恒温保持後に 422 nm の吸光度を測定する。結果は図 1 及び表 II から明らかである。測定の再現性も感度も分別により改良される。

【0039】

*

表 II

血清中の LH の再現性

LH nIU/ml	再現性 パッチ		
	好適な参考 パッチ	分別していない	好適ではない
		好適ではないパ ッチのうちの好 適な画分	全パッチ 13 (分別せず)
		(画分 4+5+6)	
対照血清 1	94.4	100%	95% 111%
対照血清 2	13.5	100%	101% 120%
ヒト血清 1	21.7	100%	99% 118%
ヒト血清 2	25.5	100%	100% 118%
ヒト血清 3	2.3	100%	89% 136%

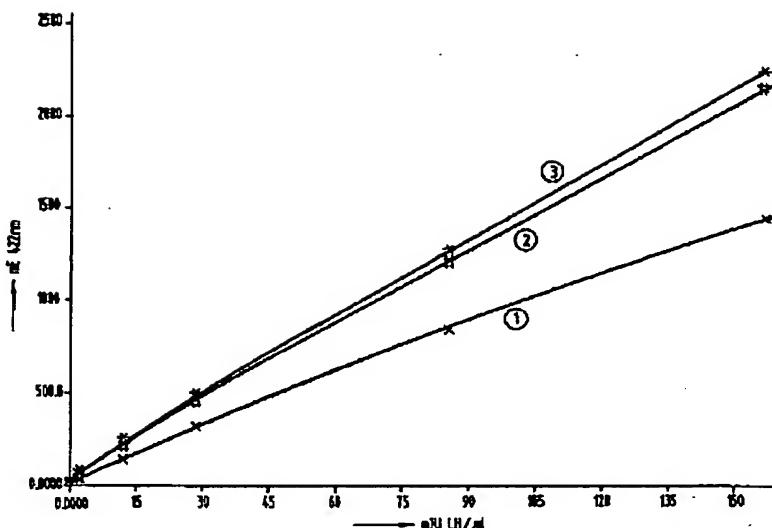
【図面の簡単な説明】

【図 1】分別していない界面活性剤 (1)、参照パッチ

(2) 及び分別した界面活性剤の画分 5 (表 I 参照)

(3) による LH 試験の検量曲線を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 クリストイアン クライン
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム ブリ
ユーテンシユトラーセ 16

(72)発明者 ハンス-ヴエルナー グリーサー
ドイツ連邦共和国 トウツツインク フォ
ン-キユールマン-シユトラーセ 11 ア

(72)発明者 ウーヴェ コーポルト
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム フア
イルヒエンヴェーク 7